

УДК 577.2

РОЛЬ ГЕНОВ *LAM* В ГИБЕЛИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *S. cerevisiae*, ВЫЗВАННОЙ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ПОЛОВОГО ФЕРОМОНА*

© 2020 С.С. Соколов^{1**}, К.В. Галкина¹, Е.А. Литвинова²,
Д.А. Кнорре^{1,3}, Ф.Ф. Северин¹

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sviatoslav.sokolov@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.11.2019

После доработки 21.01.2020

Принята к публикации 21.01.2020

Белки Lam1–Lam4 осуществляют незвукулярный транспорт стерина из плазматической мембраны (ПМ) в эндоплазматический ретикулум, нарушение их работы приводит к увеличению содержания стерина в ПМ. У животных гомологи белков Lam отвечают за интернализацию холестерина из плазмы крови. Биологическая роль дрожжевых белков Lam остается неясной, так как выраженные фенотипы у штаммов с делецией отдельных генов *LAM* не наблюдаются. Однако известно, что делеция *LAM1* (*YSP1*) препятствует регулируемой гибели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванной половым феромоном. Мы исследовали, будет ли мутация по гену *LAM2* также влиять на гибель клеток в присутствии избытка полового феромона и оценили характер генетических взаимодействий между *LAM2* и генами, отвечающими за биосинтез эргостерина. Мы показали, что делеция *LAM2* частично предотвращает гибель клеток дрожжей лабораторного штамма *W303*, вызванную половым феромоном. При этом делеция трех других генов *LAM* – *LAM1*, *LAM3* и *LAM4* – дополнительно не увеличивала этот эффект. Мутация в гене транскрипционного фактора *UPC2*, приводящая к избыточному накоплению стерина в клетке (*UPC2-1*), приводила к увеличению выживаемости клеток в присутствии α -фактора и проявляла аддитивность с делецией *LAM2*. В то же время в лабораторном штамме *BY4741* делеция *LAM2* наоборот стимулировала гибель клеток, вызванную феромоном. Мы обнаружили, что делеция генов биосинтеза эргостерина *ERG2* и *ERG6* снижала эффект от делеции *LAM2*. В штамме *Derg4*, в котором делетирован ген терминального этапа пути биосинтеза эргостерина, делеция *LAM2* заметно увеличивала долю мертвых клеток и снижала скорость роста суспензионной культуры клеток этого штамма даже в отсутствие феромона. Мы предполагаем, что отсутствие эффекта от делеции гена *LAM2* в штаммах *Derg6* и *Derg2* указывает на неспособность Lam2p транспортировать некоторые интермедиаты биосинтеза эргостерина, такие как ланостерин. В совокупности наши данные говорят о том, что роль белков Lam в клеточной смерти дрожжей, вызванной феромоном, обусловлена их воздействием на стеринный состав ПМ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гены *LAM*, дрожжи, клеточная смерть, половой феромон, стерин.

DOI: 10.31857/S0320972520030057

У многоклеточных организмов запрограммированная гибель клеток (запрограммированная клеточная смерть, ЗКС) играет важную роль в индивидуальном развитии, иммунитете и поддержании тканевого гомеостаза [1, 2]. Наличие и физиологическая роль ЗКС у одноклеточных организмов до сих пор остается открытым воп-

росом. В случае хорошо изученного модельного объекта — пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — принято различать: СКС (случайную клеточную смерть, accidental cell death), вызванную стрессорными факторами высокой интенсивности и сопряженной с потерей барьерной функции плазматической мембраны (ПМ), и

Принятые сокращения: ЗКС — запрограммированная клеточная смерть, КОЕ — колониеобразующая единица; ПМ — плазматическая мембрана; РКС — регулируемая гибель клеток; ЭР — эндоплазматический ретикулум.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», BM19-339, 24.02.2020.

** Адресат для корреспонденции.

РКС (регулируемую клеточную смерть) [3]. Под РКС подразумевают клеточную гибель, вызванную слабыми стрессорными условиями, внешними или внутренними сигналами, которые можно искусственно предотвратить, например, путем выключения работы определенных генов. ЗКС является естественным (физиологическим) сценарием РКС. В настоящее время описано довольно много индукторов РКС дрожжей и других одноклеточных организмов, однако физиологическая роль РКС во многих случаях остается неизвестной [4–8].

Ранее мы показали, что высокая концентрация полового феромона α -фактора (100 мкг/мл) вызывает РКС дрожжей *a*-типа спаривание [9, 10]. Действие полового феромона сопровождается увеличением в цитоплазме концентрации кальция [11], поэтому было высказано предположение, что увеличение концентрации кальция в цитоплазме может быть фактором, принимающим участие в развитии цепи событий, приводящей к гибели клеток [10]. Антиаритмический препарат амиодарон также вызывает увеличение концентрации кальция в цитоплазме [12] и активирует цепь событий внутри клетки, схожую с той, которая включается в ответ на добавление 100 мкг/мл феромона [10]. Следует отметить, что даже такие высокие концентрации α -фактора приводят к гибели лишь определенной фракции клеток в суспензии, в то время как существенная часть (50–80%) клеток сохраняют жизнеспособность. Размер этой фракции зависит от штамма и дальнейшее увеличение концентрации феромона не приводит к увеличению доли мертвых клеток [13]. Механизмы, ограничивающие гибель клеток в присутствии избытка полового феромона, до сих пор неизвестны. Мутация в гене кальмодулина *cmd1-6* [9] или делеция гена метаксазы дрожжей *MCA1* [13] приводят к значительному увеличению количества мертвых клеток в присутствии избытка феромона.

Ранее мы провели два скрининга, направленных на поиск генов – положительных регуляторов ЗКС дрожжей, вызванной феромоном и амиодароном. В результате были выявлены гены *LAM1* и *LAM2*, снижающие резистентность клеток к амиодарону [10, 14]. Первоначально эти гены были названы *YSP1* и *YSP2* (от Yeast Suicidal Proteins), однако позднее переименованы в *LAM1* и *LAM2* (от *LAM* – Lipid transfer protein Anchored at Membrane contactsites, транспортер липидов, заякоренный в контактных сайтах мембраны) соответственно. Делеция гена *LAM1* также частично защищала клетки от гибели, вызванной феромоном [10].

Недавно было показано, что *LAM1* и *LAM2* кодируют белки, принадлежащие одному се-

мейству мембранных стерин-связывающих белков [15]. Функция этих белков, предположительно, заключается в транспорте стерина между ПМ и эндоплазматическим ретикуломом (ЭР). В случае многоклеточных животных такой транспорт необходим для захвата холестерина из плазмы крови [16]. Для пекарских дрожжей было показано, что делеция *LAM1* приводит к снижению резистентности клеток к антигрибковому препарату амфотерицину В [15]. Поскольку амфотерицин В способен встраиваться и нарушать функции только тех мембран, где содержится эргостерин [17], увеличение чувствительности делеционных мутантов *Δlam1* и *Δlam2* к амфотерицину В указывает на то, что нарушение транспорта стерина в дрожжах приводит к увеличению содержания эргостерина в плазматической мембране. Недавно мы показали, что делеции генов семейства *LAM* действительно приводят к увеличению содержания стерина в плазматической мембране и во внутренних компартментах клетки [18].

Помимо *LAM1* и *LAM2* в геноме пекарских дрожжей есть еще четыре паралогичных гена того же семейства: *LAM3*, *LAM4*, *LAM5* и *LAM6*. При этом синтезируемые ими белки *Lam1*, *Lam2*, *Lam3* и *Lam4* локализованы в местах контактов ПМ и ЭР, в то время как *Lam5* и *Lam6* – в местах контакта ЭР и митохондрий (см. обзоры Alli-Balogun и Levine [19] и Sokolov et al. [20]).

Открытие роли белков *Lam* в транспорте стерина поставило вопрос о роли стеринового состава мембраны в РКС дрожжей. Возможно, эффекты делеций генов *LAM1* и *LAM2*, на РКС, вызванную феромоном, амиодароном и ацетатом, являются следствием изменения содержания эргостерина в ПМ. В этом случае другие воздействия на клетку, повышающие или понижающие содержание стерина в дрожжах, предположительно, будут оказывать такое же воздействие. Альтернативой этому предположению является непосредственное участие белков *Lam* в трансдукции сигнала, приводящего к гибели клеток. Более того, до сих пор не известно способны ли паралогичные гены *LAM* дублировать функции друг друга или каждый из них имеет свою узкую специализацию внутри клетки.

В своей работе мы исследовали РКС, вызванную высокой концентрацией полового феромона и амиодароном. Для этих индукторов РКС мы оценили роль делеций гена *LAM2* и мутаций, приводящих как к увеличению содержания стерина (*UPC2-1*), так и к нарушению терминальных стадий биосинтеза стерина (*Δerg2*, *Δerg3*, *Δerg4*, *Δerg6*). Кроме того, мы сравнили эффект от одиночной делеции гена *LAM2* с эф-

фектом от делеции всех четырех генов *LAM* (*LAM1–LAM4*). Полученные нами и ранее опубликованные данные указывают на то, что роль генов *LAM* в РКС дрожжей опосредована изменениями в стеринном составе мембраны.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, условия культивирования дрожжей и реагенты. Реактивы, используемые в исследовании: амиодарон, α -фактор, пропиция йодид, синтетическая среда YNB, аминокислотные добавки и галактоза («Sigma-Aldrich», США), дрожжевой экстракт, пептон и агар («Difco», США), глюкоза («Helicon», Россия). Клетки выращивали на средах: YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) и YPGal (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон и 2% галактоза). В твердые среды добавляли агар до 2%. Штаммы *UPC2-1*, *Δlam1*, *Δlam2*, *Δlam3*, *Δlam4* и *Δlam1Δlam2Δlam3Δlam4* – производные *W303*. Штаммы *Δerg2*, *Δerg2Δusp2*, *Δerg3*, *Δerg3Δusp2*, *Δerg4*, *Δerg4Δusp2*, *Δerg5*, *Δerg5Δusp2*, *Δerg6*, *Δerg6Δusp2* – производные штамма *BY4741* (таблица).

Смена типа спаривания. Для смены типа спаривания мы трансформировали штаммы плазмидой pGAL-НО, в которой закодирована экзонуклеаза НО под контролем галактозо-регулируемого промотора P_{GAL}, по методу, опубликованному в работе Herskowitz и Jensen [21]. Полученные штаммы инкубировали ночь в среде YPGal (2% галактоза) и переносили на твердую среду YPD (2% глюкоза). Тип спаривания полученных таким образом отдельных колоний определяли контрольным скрещиванием со штаммами α и альфа типа. Колонии с нужным типом спаривания сутки выращивали в жидкой среде YPD для потери плазмиды pGAL-НО. Потерю плазмиды pGAL-НО проверяли по отсутствию роста на селективной среде YNB-leu («Sigma-Aldrich», США).

Индукция РКС амиодароном, и оценка жизнеспособности клеток дрожжей. Клетки выращивали 12–16 ч до логарифмической стадии роста и разводили до конечной плотности 4×10^6 клеток/мл в YPD с добавлением 25 мМ MES (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота) («Sigma-Aldrich», США), pH 5,5. К суспензии клеток добавляли амиодарон до конечной концентрации 60 мкМ. Инкубацию с амиодароном проводили в течение часа при 30 °С. Затем клетки разбавляли и переносили на твердую среду YPD. Через 24 ч измеряли долю выживших клеток, как соотношение колониеобразующих единиц (КОЕ) после стресса к КОЕ до стресса.

Оценка эффективности скрещивания штаммов. Клетки обоих типов спаривания выращивали 12–16 ч до логарифмической стадии роста и разводили в жидкой YPD до конечной плотности $\sim 2 \times 10^6$ клеток/мл. Далее смешивали клетки противоположных типов спаривания и инкубировали 6 ч при 30 °С. После инкубации смесь клеток микроскопировали и подсчитывали долю зигот на 250–300 клеток.

Проточная цитофлуориметрия, индукция РКС половым феромоном. Клетки выращивали 12–16 ч в жидкой среде YPD до конечной плотности 4×10^6 клеток/мл. К суспензии добавляли α -фактор до конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 4 ч на качалке («New Brunswick Scientific», США) при 200 об./мин 30 °С. В качестве отрицательного контроля использовали суспензию клеток, не обработанную α -фактором, которую также инкубировали 4 ч на качалке при 30 °С. В качестве положительного контроля (мертвые клетки) использовали суспензию клеток, которую инкубировали 3 ч при 50 °С. После инкубации все образцы разводили в 8 раз в фосфатно-солевом буфере PBS («Gibco», США) и окрашивали пропицией йодидом в концентрации 0,5 мкг/мл в течение 10 мин. Пропицией йодид – флуоресцентный зонд, не способный проникать в живые клетки и окрашивающий мертвые клетки [22]. Флуоресценцию клеток, окрашенных пропицией йодидом, анализировали с помощью проточных цитофлуориметров CytoFlex («Beckman», США) и Beckman Coulter FC 500 («Beckman», США) при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссионном фильтре 690/50 нм. Каждый эксперимент был выполнен не менее чем в трех независимых повторениях, полученных в разные дни. В каждом эксперименте анализировали не менее 10 000 событий (клеток).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Делеция гена *LAM2* частично предотвращает гибель клеток, вызванную избытком полового феромона, и не проявляет аддитивность с делециями генов *LAM1*, *LAM3* и *LAM4*.

Как отмечалось выше, в геноме дрожжей содержатся четыре гена *LAM* (*LAM1–LAM4*). Кодированные ими белки (Lam1–Lam4) локализованы в местах контакта ПМ и ЭР. Ген *LAM2* (*YSP2*) был ранее найден нами в результате генетического скрининга, направленного на поиск мутаций, снижающих чувствительность к амиодарону [14]. Этот ген является паралогом гена *LAM1* (*YSP1*) [15], делеция которого частично предотвращает гибель клеток, вызванную высокой

Штаммы, использованные в исследовании

Штамм	Генотип	Родительский штамм или источник
<i>W303-1A</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3</i>	Laboratory of A. Hyman
<i>Δlam2</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 Δlam2::TRP1</i>	[14]
<i>Δlam1Δlam2</i> <i>Δlam3Δlam4</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 Δlam3::kanMX4 Δlam2::TRP1 Δlam1::NAT Δlam4::loxP</i>	[35]
<i>UPC2-1 MATa</i>	<i>MATa UPC2-1 ura3-1 his3-11,-15 leu2-3,-112 trp1-1</i>	<i>UPC2-1 MATalpha</i>
<i>UPC2-1 Δlam2</i>	<i>MATa UPC2-1 ura3-1 his3-11,-15 leu2-3,-112 trp1-1 Δlam2::HIS3</i>	<i>UPC2-1 MATa</i>
<i>PGAL-LAM2</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 PGAL-LAM2::kanMX4</i>	<i>W303-1A</i>
<i>cmd1-6</i>		[10]
<i>BY4741</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>BY4742</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>Δerg2MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg2::kanMX4</i>	<i>Δerg2 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg3MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3::kanMX4</i>	<i>Δerg3 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg4MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg4::kanMX4</i>	<i>Δerg4 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg5MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg5::kanMX4</i>	<i>Δerg5 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg6MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg6::kanMX4</i>	<i>Δerg6 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg2 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg2::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg2 MATa</i>
<i>Δerg3 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg3 MATa</i>
<i>Δerg4 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg4::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg4 MATa</i>
<i>Δerg5 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg5::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg5 MATa</i>
<i>Δerg6 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg6::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg6 MATa</i>

концентрацией α -фактора [10]. Мы проверили, будет ли делеция остальных трех генов (*LAM1*, *LAM3* и *LAM4*) ингибировать РКС, вызванную феромоном. Для этого мы сравнили соотношение живых и мертвых клеток в суспензионной культуре клеток дрожжей, подверженных действию α -фактора (100 мкг/мл, 4 ч). Мы различали живые и мертвые клетки по накоплению ими пропидий йодида с помощью проточной цитофлуориметрии (рис. 1, а, б). Пропидий йодид способен проникать только в мертвые клетки, в то время как живые клетки с целостной плазматической мембраной остаются неокрашенными. Добавление α -фактора приводило к гибели

~45% клеток (рис. 1, в), а мутация в гене кальмодулина увеличивала чувствительность клеток к воздействию α -фактора (рис. 1, г), что соответствует данным литературы [23]. Мы обнаружили, что делеция гена *LAM2* частично предотвращала гибели клеток под действием α -фактора (рис. 1, д). Одновременно с оценкой сигнала от пропидий йодида мы оценивали линейные размеры клеток по светорассеянию. Как видно из рис. 1, α -фактор вызывал значительное увеличение линейного светорассеяния (FSC-A). Это увеличение размера индивидуальных клеток, по всей видимости, обусловлено образованием «шму» — половых выростов и увеличением объ-

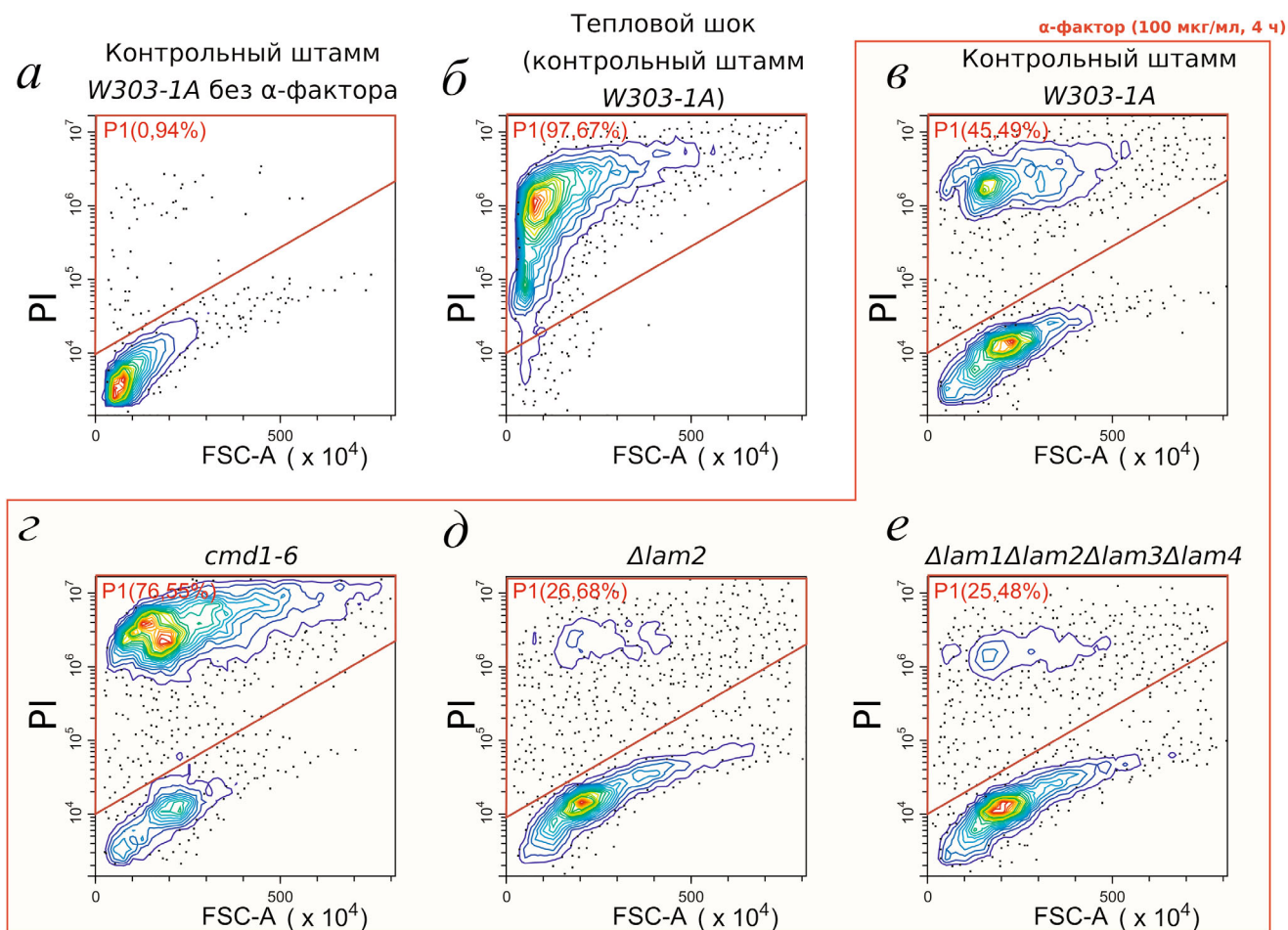


Рис. 1. Распределение линейных размеров (FSC-A) клеток и интенсивности сигнала от пропидий йодида (PI). *a* – Контрольные клетки W303-1A в отсутствие стресса (отрицательный контроль на мертвые клетки); *б* – клетки W303-1A подвергнутые действию теплового шока – 50°C, 3 ч (положительный контроль на мертвые клетки); *в–е* – клетки, подвергнутые действию α-фактора (100 мкг/мл, 4 ч) различных штаммов: родительский штамм (*в*); штамм с мутацией в гене кальмодулина *cmd1-6* (*з*); штамм с делецией гена *LAM2* (*д*); штамм с делециями всех четырех генов *LAM* (*LAM1–LAM4*) (*е*). На графиках обозначена зона (gate), событие в которой расценивались нами как мертвые клетки. Для каждого из условий указан процент мертвых клеток от общего числа клеток. Данные репрезентативных экспериментов, по 10 000 событий в каждом эксперименте.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

ема клеток. Делеция гена *LAM2* не препятствовала увеличению линейного светорассеяния, что свидетельствует о чувствительности клеток к половому феромону.

Как видно из рис. 2, делеция *LAM2* оказывает наибольший эффект из проверенных генов *LAM* на устойчивость к α-фактору, делеция дополнительно трех генов *LAM* на фоне делеции *LAM2* не привела к увеличению выживаемости клеток в присутствии полового феромона. Аналогичный результат мы получили в случае с другим индуктором РКС дрожжей — амиодароном. Ранее мы показали, что добавление амиодарона к клеткам вызывает каскад событий, что и при добавлении избытка полового феромона [10].

Также, как и в случае с α-фактором, нарушение *LAM2* оказывало максимальный эффект, и мы не обнаружили значимой разницы в резистентности к амиодарону между штаммом *Δlam2* и штаммом *Δlam1Δlam2Δlam3Δlam4* с делецией четырех генов *LAM* (рис. 3, *a*).

РКС, вызванная половым феромоном, снижена в штамме UPC2-1. Штамм с частично доминантным аллелем *UPC2-1* демонстрирует повышенную скорость захвата стерина клетками [24] и активирует транскрипцию генов *ERG*, что приводит к увеличению содержания стерина в клетке и ПМ в частности [25]. Делеция генов *LAM* также приводит к увеличению концентрации эргостерина в плазматической мембране

[15, 25]. Если резистентность делеционных штаммов по генам *LAM* обусловлена изменениями концентрации эргостерина в ПМ, то аллель *UPC2-1* также должен предотвращать гибель клеток, вызванную половым феромоном. Что-

бы проверить это предположение мы исследовали гибель дрожжей штамма *UPC2-1* и дикого типа под действием α -фактора (100 мкг/мл). На рис. 4 приведена типичная контурная диаграмма, где по одной оси отложена интенсивность

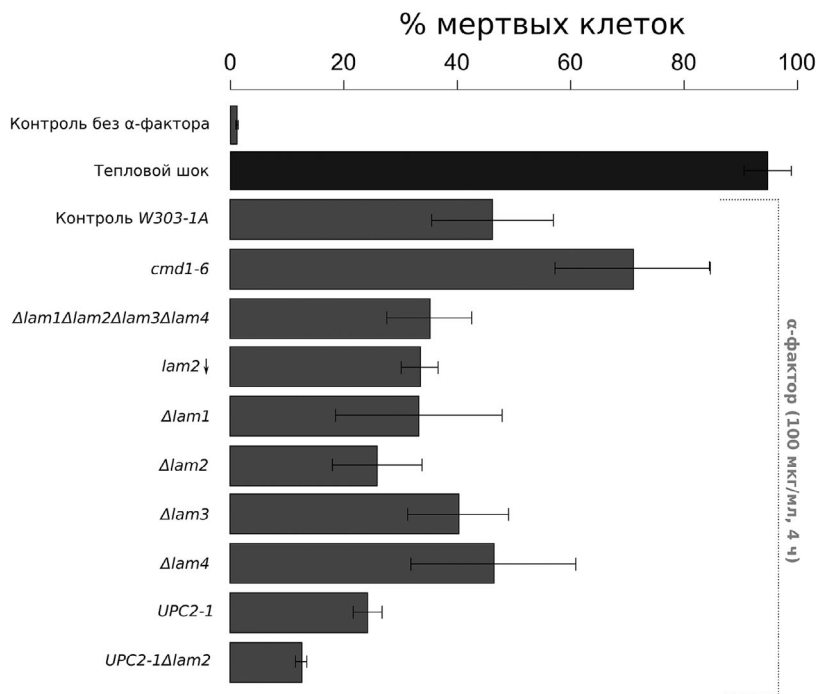


Рис. 2. РКС клеток дрожжей с нарушенным транспортом и накоплением эргостерина, вызванным добавлением α -фактора (100 мкг/мл). Соотношение мертвых и живых клеток оценивали с помощью пропидий йодида и проточной цитофлуориметрии. На столбчатых диаграммах указано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$)

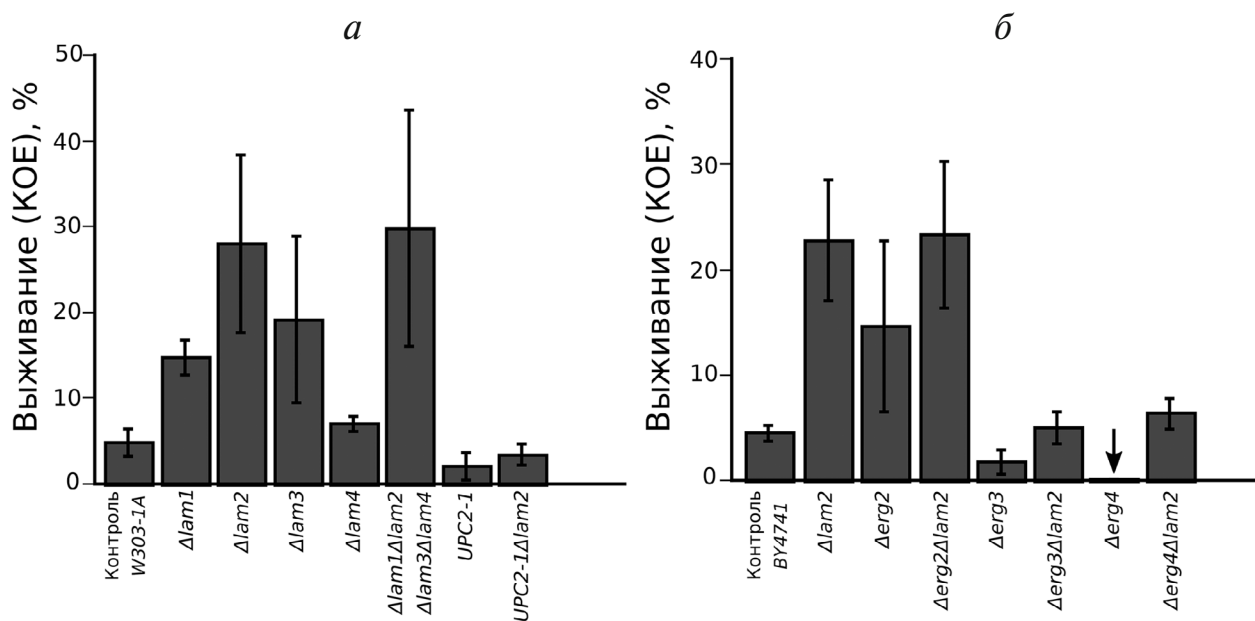


Рис. 3. Выживание клеток в присутствии индуктора РКС дрожжей амиодарона (60 мкМ, 1 ч инкубации). За 100% приняли количество клеток (КОЕ) в начальный момент времени (до добавки амиодарона)

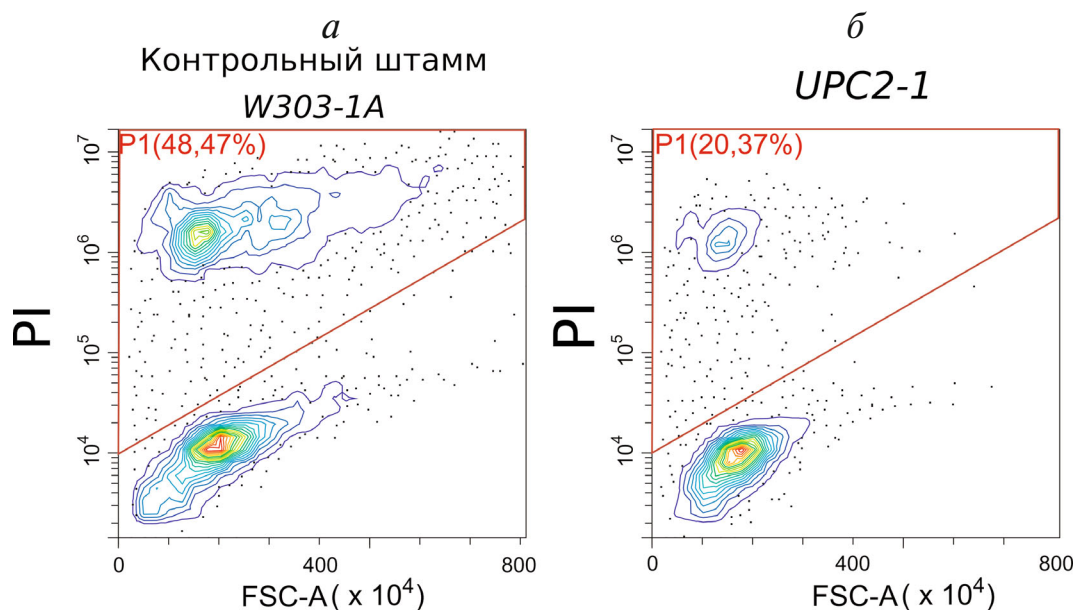


Рис. 4. Распределение линейных размеров (FSC-A) клеток и интенсивности сигнала от пропидий йодида (PI) в клетках дрожжей дикого типа (а) и мутантного штамма *UPC2-1* (б). Клетки инкубировали 4 ч в присутствии 100 мкг/мл α -фактора. Данные репрезентативных экспериментов, 10 000 событий в каждом эксперименте.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

сигнала от пропидий йодидом, а по другой оси – линейный размер клеток, который мы оценивали по амплитуде линейного светорассеяния (FSC-A). Как видно из рисунка, мутация *UPC2-1* приводила к снижению относительного числа клеток, окрашенных пропидий йодидом,

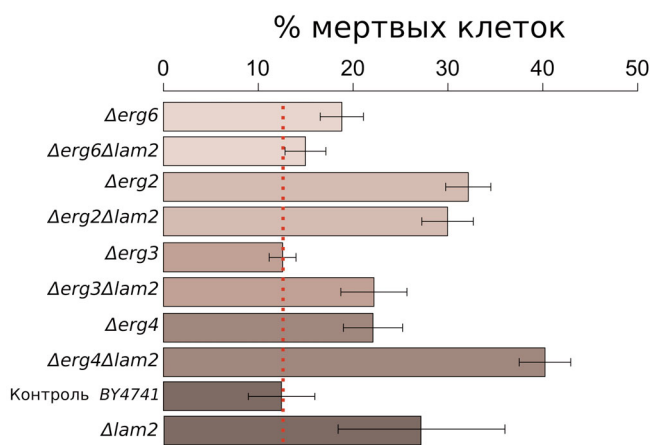


Рис. 5. РКС клеток дрожжей с мутациями по генам биосинтеза эргостерина, вызванная добавлением α -фактора (100 мкг/мл). Соотношение мертвых и живых клеток оценивали с помощью пропидий йодида и проточной цитофлуориметрии. На столбчатых диаграммах указано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

значит эта мутация ингибирует гибель клеток, вызванную α -фактором (см. также рис. 2, где представлены усредненные данные трех экспериментов). В отношении амиодарона штамм с мутацией *UPC2-1* напротив продемонстрировал повышенную чувствительность (рис. 3, а). Сравнение частоты образования зигот при скрещивании штаммов *UPC2-1 MATa* с *UPC2-1 MATalpha* (2,2%), $\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4MATa$ с $\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4MATalpha$ (1,8%) и дикого типа *BY4741 (MATa)* с *BY4742 (MATalpha)* (2,3%) не выявило различий, а значит повышенная устойчивость *UPC2-1* и $\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4$ к α -фактору не связана со снижением ответа клеток на него.

Генетические взаимодействия *LAM2* и генов биосинтеза эргостерина. В следующей серии экспериментов мы исследовали РКС дрожжей, вызванную феромоном и амиодароном, на клетках дрожжей с делециями генов *ERG2–ERG6*. Эти гены кодируют ферменты, катализирующие терминальные этапы биосинтеза эргостерина. Нарушение биосинтеза эргостерина, как правило, летально [26], однако делеция генов, которые кодируют ферменты терминальных стадий биосинтеза от ланостерина до эргостерина, не приводит к потере клетками жизнеспособности [26]. Из нашего анализа мы исключили ген *ERG5*, так как штамм *Δerg5* с высокой частотой (до 80%) терял митохондриальную ДНК, а поте-

ря митохондриальной ДНК значительно снижает чувствительность клеток к α -фактору [9, 10]. Следует также отметить, что в этой серии опытов мы использовали другой родительский штамм (*BY4741*), тогда как эксперименты с *UPC2-1* проводили на штаммах, полученных на основе лабораторного штамма *W303*. Чувствительность этих лабораторных штаммов к феромону значительно различалась.

Мы оценили процент мертвых клеток дрожжей в штамме дикого типа и в штаммах с делецией генов: *ERG6*, *ERG2*, *ERG3* и *ERG4* (рис. 5). На рис. 5 результаты с разными делеционными мутантами по генам *ERG* приведены в последо-

вательности, соответствующей реакциям биосинтеза эргостерина ферментами, закодированными этими генами. Как видно из рисунка, делеция генов *ERG* не снижала, а иногда даже увеличивала долю мертвых клеток в присутствии α -фактора. При этом делеция *LAM2* в штаммах $\Delta erg6$ и $\Delta erg2$ не оказывала значительного эффекта на РКС, индуцированную феромоном (рис. 5). В то же время мы не наблюдали снижения РКС дрожжей от делеции в штаммах с нарушенным синтезом эргостерина. Делеция *LAM2* в штамме $\Delta erg4$ и в контрольном штамме *BY4741* приводила к существенному увеличению доли мертвых клеток в присутствии α -фактора.

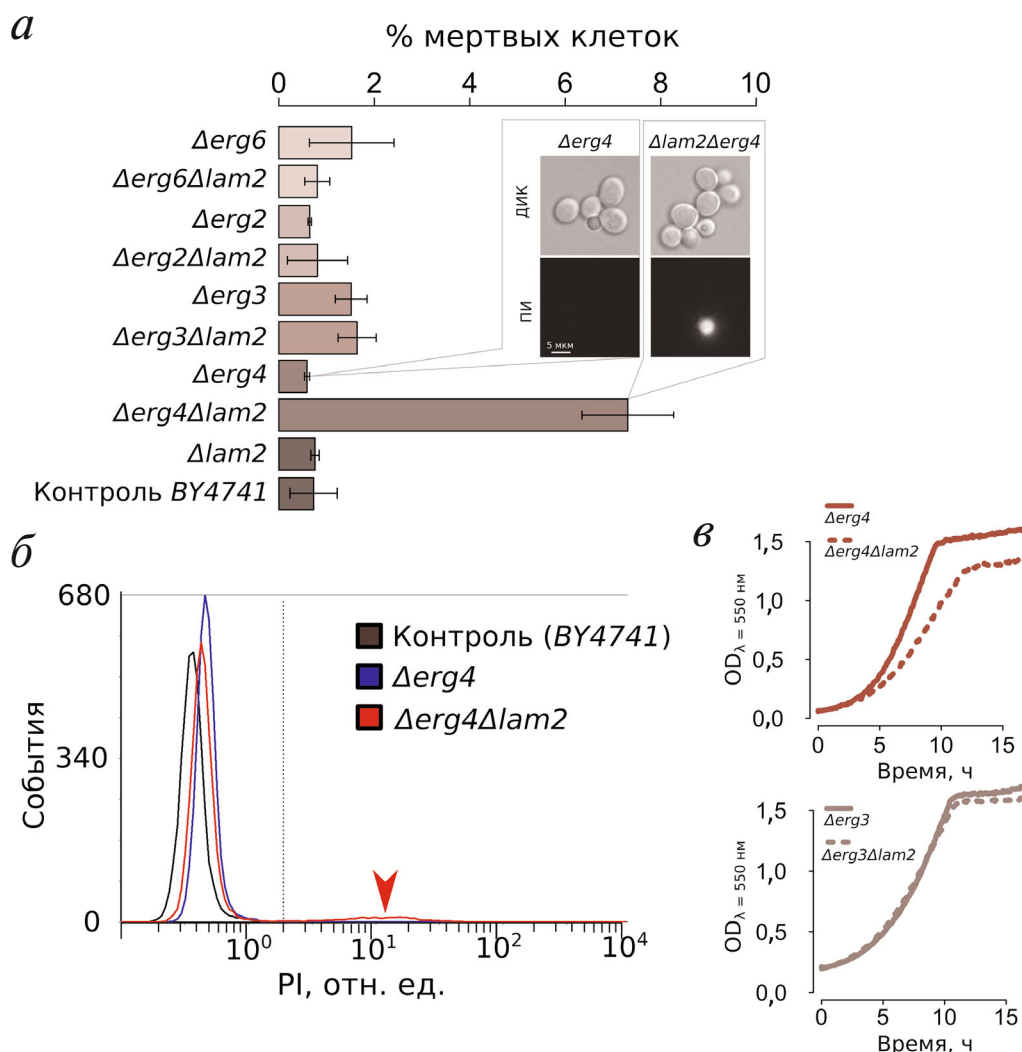


Рис. 6. Штамм $\Delta erg4\Delta lam2$ с двойной делецией содержит субпопуляцию мертвых клеток, окрашиваемых пропидий йодидом, и обладает сниженной скоростью роста. *а* – Анализ выживаемости штаммов в контрольных условиях (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 3$); во вставке представлена фотография клеток штаммов $\Delta erg4\Delta lam2$ и $\Delta erg4$, окрашенных пропидий йодидом. *б* – Репрезентативная гистограмма эксперимента с проточного цитофлуориметра. *в* – Сравнение скоростей роста штаммов $\Delta erg4$ и $\Delta erg4\Delta lam2$ (сверху), $\Delta erg3$ и $\Delta erg3\Delta lam2$ (снизу) по увеличению светорассеяния (длина волны $\lambda = 550$ нм).

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Мы обратили внимание, что в штамме *Δerg4Δlam2* с двойной делецией даже в отсутствии полового феромона количество мертвых (пропидий йодид положительных) клеток значительно увеличено по сравнению с родительским штаммом и со всеми другими исследованными нами двойными и одиночными мутантами (рис. 6, а, б). Мы показали, что делеция *LAM2* существенно снижает скорость роста штамма, в котором делетирован ген *ERG4*, в то время как при делеции гена *ERG3*, находящегося на один шаг выше по каскаду в метаболическом пути биосинтеза стерина, такого эффекта не наблюдается (рис. 6, в). Таким образом, наши данные указывают на эпистаз между геном *LAM2* и геном *ERG4*.

Исследование устойчивости к амиодарону показало, что делеция *LAM2* повышает выживаемость клеток на фоне всех испытанных мутаций (*Δerg2*, *Δerg3*, *Δerg4* и *UPC2-1*) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование генов *LAM* в пекарских дрожжах затруднено из-за того, что они представлены паралогичными парами [20]. В связи с этим до сих пор было описано довольно мало фенотипов для штаммов, в которых нокаутированы отдельные гены *LAM*. Так, например, нами ранее было показано, что делеция *LAM2* приводит к увеличению раздробленности митохондриальной сети в клетках, находящихся в стационарной фазе роста [27]. Исключениями являются устойчивость к амиодарону, показанная нами ранее для *Δlam1* и *Δlam2* [10, 14], и устойчивости к α -фактору, которая показана для штамма *Δlam1* [10]. В этой работе мы показали, что делеция *LAM2* также демонстрирует заметное снижение чувствительности штамма *W303 S. cerevisiae* к РКС, вызванной α -фактором (рис. 1, 2). Далее, воспользовавшись этим выраженным фенотипом в качестве тест-системы для изучения генетических взаимодействий, мы исследовали РКС, вызванную феромоном в штамме *Δlam1Δlam2Δlam3Δlam4* с четверной делецией. Делеция дополнительных генов *LAM* не привела к снижению чувствительности штамма к α -фактору дополнительно к тому, что наблюдалось в штамме с одиночной делецией *Δlam2*. Полученный результат говорит о том, что другие белки Lam не проявляют функции, связанной с клеточным ответом на половой феромон, если нокаутирован ген *LAM2*. Можно предположить, что белки Lam функционируют в качестве гетеродимеров и наличие *LAM2* является необходимым фактором для их работы, однако проверка

этого предположения требует дополнительных исследований. С другой стороны, штаммы с одиночными делециями *Δlam3* и *Δlam4* не вызвали устойчивости к α -фактору (рис. 2). Учитывая данные широкомасштабных масс-спектрометрических протеомных анализов, что Lam2p содержится в клетках в больших количествах, чем другие белки Lam [28, 29], можно предположить, что отсутствие эффекта делеций *LAM3* и *LAM4* на резистентность к РКС, вызванной α -фактором, связано с разницей в концентрации этих белков в стандартных условиях. Однако в этих анализах количество Lam2p не превышало суммарного количества его трех паралогов, а в другой работе с упрощенным протоколом подготовки проб к масс-спектрометрии Lam1p даже был обнаружен в больших количествах [30]. Таким образом, мы считаем, что отсутствие эффекта от делеции генов *LAM1*, *LAM3*, *LAM4* в штамме *Δlam2* не связано с низким содержанием этих белков в клетке, а отражает их функциональную взаимосвязь. Распределение вклада делеций генов *LAM* в устойчивость к амиодарону оказалось сходным: *LAM2* вносит основной вклад, а дополнительное нарушение генов *LAM1*, *LAM3*, *LAM4* не увеличивает устойчивость.

Лабораторный штамм *BY4741* оказался значительно более резистентным к РКС, вызванной α -фактором, чем штамм *W303*. При этом делеция гена *LAM2* не уменьшала, а наоборот увеличивала долю мертвых клеток в нашей экспериментальной модели с половым феромоном (рис. 5). В то же время эффект делеции *LAM2* на резистентность к амиодарону не зависел от генетического фона, который мы использовали (рис. 4). Считается, амиодарон вызывает тот же каскад событий в клетке, что и половой феромон, но на более поздних стадиях — амиодарон стимулирует вход избытка кальция в цитоплазму клетки [10, 12]. По-видимому, это происходит из-за гиперполяризации ПМ вследствие нарушения функционирования ионных каналов [31]. Вероятно, вызванное делецией *LAM2* повышение эргостерина на ПМ влияет как на активность ионных каналов ПМ, так и на активность феромонового рецептора. При этом эффект гена *LAM2* на каскад событий, вызванный половым феромоном, сильно зависит от генетического фона. Картирование мутаций, обеспечивающих различие штаммов *BY4741* и *W303* по отношению к РКС, вызванной половым феромоном, требует дополнительных исследований. Однако на основании представленных в этой работе результатов можно заключить, что роль генов *LAM* в РКС, вызванной феромоном, не консервативна и зависит от других генетических факторов.

Мы обнаружили аддитивность между эффектами от делеций генов *LAM2* и *ERG4* (рис. 5, 6). *ERG4* кодирует С-24(28) стерин редуктазу, которая катализирует последнюю реакцию метаболического пути биосинтеза эргостерина в дрожжах [32]. При этом в штамме *Δerg3*, где отсутствует фермент, катализирующий предпоследнюю реакцию этого же пути, эффект от делеции *LAM2* был меньше в абсолютном выражении. На фоне делеций генов *ERG2* и *ERG6* изменений резистентности к феромону мы не обнаружили. Делеция генов биосинтеза эргостерина приводит к изменению стеринового состава клеточных мембран – эргостерин замещается на интермедиаты его биосинтеза [33]. Делеция *ERG6* и *ERG2* обрывает биосинтез на зимостерине и фекостерине соответственно [34], однако нам не известны работы, в которых бы определяли количественное распределение интермедиатов биосинтеза стерина в делеционных штаммах. Мы предполагаем, что отсутствие эффекта от делеции *LAM2* в штаммах *Δerg2* и *Δerg6* связано с тем, что *LAM2* не способен полностью или частично транспортировать зимостерин, фекостерин и ланостерин – ранние интермедиаты биосинтеза. В этом случае делеция гена *LAM2* никак не может повлиять на фенотип клеток. В то же время согласно предлагаемой нами модели, поздние интермедиаты биосинтеза и эргостерин транспортируются *LAM2*.

Сам факт того, что делеции *LAM* снижают смерть дрожжевых клеток от высоких концентраций полового феромона и амиодарона, известен уже более десяти лет [10, 14]. Тем не менее молекулярный механизм участия белков Lam в этих типах РКС оставался неясен. Планируя наше исследование, мы рассматривали две возможности: (1) мутации по генам *LAM* влияют на РКС опосредованно, влияя на эргостерин ПМ; (2) белки Lam непосредственно взаимодействуют с сигнальными молекулами ПМ. Наши данные указывают на первую возможность, так как все другие вмешательства в гомеостаз стерина в клетке также сильно влияли на устойчивость клеток к этим типам РКС. Вероятно, делеции генов *LAM* приводят к увеличению эргостерина в ПМ. Это следует из приведенных выше данных по чувствительности к амфотерицину В, а также из наших недавних работ по чувствительности к липофильным катионам [35] и изучению влияния генов *LAM* на устойчивость к стрессу [18].

Как повышенный эргостерин ПМ может влиять на РКС? Известно, что высокий эргостерин предотвращает перемещение Urc2 в ядро. При этом Urc2 активирует транскрипцию как

минимум двух генов MAP-киназного каскада, инициируемого также феромоном [36]. Возникает предположение, что в мутантах по *LAM* повышенный эргостерол ПМ предотвращает РКС, снижая активность Urc2. Наши данные свидетельствуют против этого предположения. Действительно, гиперактивация Urc2 (мутация *UPC2-1*) не увеличивает, а снижает феромон-зависимую РКС (рис. 1, 2). Поскольку Urc2 является основным активатором синтеза эргостерина, можно предположить, что увеличение концентрации эргостерина в ПМ влияет на ионные потоки через ПМ, и это приводит к устойчивости. Действительно, известно, что мутации по генам биосинтеза эргостерина приводят к нарушениям работы различных транспортеров ПМ [37].

Повышенная чувствительность клеток штамма *UPC2-1* к амиодарону также хорошо согласуется с данными литературы. Амиодарон вызывает увеличение концентрации кальция в цитоплазме [12], что вызывает дальнейший каскад событий, приводящий к гибели клеток [10]. При этом повышение уровня эргостерина вызывает нарушения в вакуолях [38]. Нормальное функционирование вакуолей, в свою очередь, обеспечивает устойчивость к амиодарону: вакуоли способны удалять избыточный Ca^{2+} из цитоплазмы, и это их свойство критично для устойчивости к амиодарону – токсичность амиодарона опосредована подъемом Ca^{2+} [39].

Таким образом, по нашему мнению, наиболее предпочтительным объяснением роли генов *LAM* в РКС, вызванной феромоном, является следующее: гены *LAM* влияют на процессы, протекающие внутри клетки опосредованно. Эффекты их делеций связаны с изменением содержания эргостерина в плазматической мембране, которое, в свою очередь, меняет активность мембранных белков и обусловленных ими ионных потоков между внешней средой и цитоплазмой.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00151) (рис. 1, 2, 4, 5, 6) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-01183) (рис. 3).

Благодарности. Выражаем благодарность Василине Ефимовой за участие в получении двойных *Δerg Δlam2* мутантов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nagata, S. (2018) Apoptosis and clearance of apoptotic cells, *Annu. Rev. Immunol.*, **36**, 489–517, doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
- Fuchs, Y., and Steller, H. (2015) Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 329–344, doi: 10.1038/nrm3999.
- Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M.A., Zimmermann, A., Aguilera, A., Austriaco, N., et al. (2018) Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature, *Microb. Cell Fact.*, **5**, 4–31, doi: 10.15698/mic2018.01.607.
- Gordeeva, A.V., Labas, Y.A., and Zvyagilskaya, R.A. (2004) Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1055–1066, doi: 10.1023/b:biry.0000046879.54211.ab.
- Severin, F.F., Meer, M.V., Smirnova, E.A., Knorre, D.A., and Skulachev, V.P. (2008) Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1350–1353, doi: 10.1016/j.bbamer.2008.02.001.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., and Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines, *Cell Death Differ.*, **17**, 763–773, doi: 10.1038/cdd.2009.219.
- Sukhanova, E.I., Rogov, A.G., Severin, F.F., and Zvyagilskaya, R.A. (2012) Phenoptosis in yeasts, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 761–775, doi: 10.1134/S0006297912070097.
- Aouacheria, A., Cunningham, K.W., Hardwick, J.M., Palková, Z., Powers, T., Severin, F.F., and Váchová, L. (2018) Comment on «Sterilizing immunity in the lung relies on targeting fungal apoptosis-like programmed cell death», *Science*, **360**, doi: 10.1126/science.aar6910.
- Severin, F.F., and Hyman, A.A. (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*, *Curr. Biol.*, **12**, R233–R235, doi: 10.1016/j.cellbi.2005.10.023.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., and Severin, F.F. (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast, *J. Cell Biol.*, **168**, 257–269, doi: 10.1083/jcb.200408145.
- Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1985) Specific induction of Ca²⁺ transport activity in MATa cells of *Saccharomyces cerevisiae* by a mating pheromone, alpha factor, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10482–10486.
- Gupta, S.S., Ton, V.-K., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K., and Rao, R. (2003) Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **278**, 28831–28839, doi: 10.1074/jbc.M303300200.
- Zhang, N.-N., Dudgeon, D.D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., and Cunningham, K.W. (2006) Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3409–3422, doi: 10.1091/mbc.e06-03-0177.
- Sokolov, S., Knorre, D., Smirnova, E., Markova, O., Pozniakovsky, A., Skulachev, V., and Severin, F. (2006) Ysp2 mediates death of yeast induced by amiodarone or intracellular acidification, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1366–1370, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.07.005.
- Gatta, A.T., Wong, L.H., Sere, Y.Y., Calderón-Noreña, D.M., Cockcroft, S., Menon, A.K., and Levine, T.P. (2015) A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport, *Elife*, **4**, doi: 10.7554/eLife.07253.
- Sandhu, J., Li, S., Fairall, L., Pfisterer, S.G., Gurnett, J.E., Xiao, X., Weston, T.A., Vashi, D., Ferrari, A., Orozco, J.L., Hartman, C.L., Strugatsky, D., Lee, S.D., He, C., Hong, C., Jiang, H., Bentolila, L.A., Gatta, A.T., Levine, T.P., Ferng, A., Lee, R., Ford, D.A., Young, S.G., Ikonen, E., Schwabe, J.W.R., and Tontonoz, P. (2018) Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells, *Cell*, **175**, 514–529.e20, doi: 10.1016/j.cell.2018.08.033.
- Huang, W., Zhang, Z., Han, X., Tang, J., Wang, J., Dong, S., and Wang, E. (2002) Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy, *Biophys. J.*, **83**, 3245–3255, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75326-5.
- Sokolov, S., Vorobeva, M., Smirnova, E., Smirnova, A., Trushina, N., Galkina, K., Severin, F., and Knorre, D. (2020) LAM genes contribute to environmental stress tolerance but sensitize yeast cells to azoles, *Front. Microbiol.*, **11**, 38, doi: 10.3389/fmicb.2020.00038.
- Alli-Balogun, G.O., and Levine, T.P. (2019) Regulation of targeting determinants in interorganelle communication, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **57**, 106–114, doi: 10.1016/j.ccb.2018.12.010.
- Sokolov, S.S., Trushina, N.I., Severin, F.F., and Knorre, D.A. (2019) Ergosterol turnover in yeast: an interplay between biosynthesis and transport, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 346–357, doi: 10.1134/S0006297919040023.
- Herskowitz, I., and Jensen, R.E. (1991) Putting the HO gene to work: practical uses for mating-type switching, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 132–146, doi: 10.1016/0076-6879(91)94011-z.
- Sträuber, H., and Müller, S. (2010) Viability states of bacteria – specific mechanisms of selected probes, *Cytometry A*, **77**, 623–634, doi: 10.1002/cyto.a.20920.
- Moser, M.J., Geiser, J.R., and Davis, T.N. (1996) Ca²⁺-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4824–4831, doi: 10.1128/mcb.16.9.4824.
- Crowley, J.H., Leak, F.W. Jr., Shianna, K.V., Tove, S., and Parks, L.W. (1998) A mutation in a purported regulatory gene affects control of sterol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **180**, 4177–4183.
- Joshua, I.M., and Höfken, T. (2017) From lipid homeostasis to differentiation: old and new functions of the zinc cluster proteins Ecm22, Upc2, Sut1 and Sut2, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, doi: 10.3390/ijms18040772.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., and Dickson, R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14**, 1471–1510, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y.
- Knorre, D.A., Ojovan, S.M., Saprunova, V.B., Sokolov, S.S., Bakeeva, L.E., and Severin, F.F. (2008) Mitochondrial matrix fragmentation as a protection mechanism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1254–1259, doi: 10.1134/s0006297908110126.
- de Godoy, L.M.F., Olsen, J.V., Cox, J., Nielsen, M.L., Hubner, N.C., Fröhlich, F., Walther, T.C., and Mann, M. (2008) Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast, *Nature*, **455**, 1251–1254, doi: 10.1038/nature07341.
- Peng, M., Taouatas, N., Cappadona, S., van Breukelen, B., Mohammed, S., Scholten, A., and Heck, A.J.R. (2012) Protease bias in absolute protein quantitation, *Nat. Methods*, **9**, 524–525, doi: 10.1038/nmeth.2031.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic sam-

- ple processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods*, **11**, 319–324, doi: 10.1038/nmeth.2834.
31. Maresova, L., Muend, S., Zhang, Y.-Q., Sychrova, H., and Rao, R. (2009) Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone, *J. Biol. Chem.*, **284**, 2795–2802, doi: 10.1074/jbc.M806693200.
 32. Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S.D., and Daum, G. (2000) Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, *erg4p*, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **470**, 83–87, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01290-4.
 33. Liu, G., Chen, Y., Færgeman, N.J., and Nielsen, J. (2017) Elimination of the last reactions in ergosterol biosynthesis alters the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple stresses, *FEMS Yeast Res.*, **17**, doi: 10.1093/femsyr/fox063.
 34. Parks, L.W., and Casey, W.M. (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast, *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 95–116, doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.000523.
 35. Jiménez-Munguía, I., Volynsky, P.E., Batishchev, O.V., Akimov, S.A., Korshunova, G.A., Smirnova, E.A., Knorre, D.A., Sokolov, S.S., and Severin, F.F. (2019) Effects of sterols on the interaction of SDS, benzalkoniumchloride, and anovel compound, Kor105, with membranes, *Biomolecules*, **9**, doi: 10.3390/biom9100627.
 36. Höfken, T. (2017) *Ecm22* and *Upc2* regulate yeast mating through control of expression of the mating genes *PRM1* and *PRM4*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 1485–1490, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.005.
 37. Kodedová, M., and Sychrová, H. (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One*, **10**, e0139306, doi: 10.1371/journal.pone.0139306.
 38. Hongay, C., Jia, N., Bard, M., and Winston, F. (2002) *Mot3* is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **21**, 4114–4124, doi: 10.1093/emboj/cdf415.
 39. Zhang, Y.-Q., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D.S., and Rao, R. (2010) Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs, *PLoS Pathog.*, **6**, e1000939, doi: 10.1371/journal.ppat.1000939.

THE ROLE OF *LAM* GENES IN SEX PHEROMONE-INDUCED *S. cerevisiae* YEAST CELL DEATH*

S. S. Sokolov^{1**}, K. V. Galkina¹, E. A. Litvinova², D. A. Knorre^{1,3}, and F. F. Severin¹

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: sviatoslav.sokolov@gmail.com*

² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia*

³ *Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, 119992 Moscow, Russia*

Received November 3, 2019

Revised January 21, 2020

Accepted January 21, 2020

Lam1-Lam4 proteins shuttle sterols between plasma membrane and endoplasmic reticulum. Disruption of their function presumably increases plasma membrane sterol content. While in mammals the homologs of *Lam* proteins are responsible for the internalization of cholesterol from blood plasma, the biological role of *Lam* proteins in yeast remains unclear, since the deletions of individual *LAM* genes do not produce pronounced phenotypes. However, the deletion of *LAM1* (*YSPI*) interferes with regulated cell death (RCD) of *Saccharomyces cerevisiae* yeast caused by sex pheromone. Here we studied the role of *LAM2* deletion in pheromone-induced RCD and the genetic interactions between *LAM2* and the genes of ergosterol biosynthesis. The deletion of *LAM2* gene partially prevented the pheromone-induced cell death in the *W303* laboratory yeast strain. Additional deletions of *LAM1*, *LAM3*, and *LAM4* did not increase the effect of *LAM2* deletion. A mutation in the *Upc2* transcription factor gene (*UPC2-1*), leading to increased accumulation of sterols in cells, also inhibited pheromone-induced RCD, the effect being additive with the effect of *LAM2* deletion. On the contrary, *LAM2* deletion in another yeast laboratory strain, *BY4741*, stimulated pheromone-induced RCD. Next, the deletions of ergosterol biosynthesis genes *ERG2* and *ERG6* decreased the effect of the *LAM2* deletion. Interestingly, in *Δerg4* strain (with deletion of the gene encoding *Erg4* protein catalyzing the terminal stage of ergosterol biosynthesis), the deletion of *LAM2* significantly increased the proportion of dead cells and reduced the growth rate of cells in suspension even in the absence of pheromone. Possibly, the lack of the *LAM2* deletion phenotype in *Δerg6* and *Δerg2* strains indicates the inability of *Lam2* protein to transport upstream ergosterol biosynthesis intermediates, such as lanosterol. Together, our data suggest that the role of *Lam* proteins in pheromone-induced yeast RCD is mediated by their effect on the sterol composition of plasma membrane.

Keywords: *LAM* genes, yeast, regulated cell death, pheromone, sterols